

Aus der Chirurgischen Klinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. G. Hegemann

Prüfung des Einflusses von Kallikrein auf die Bindegewebsproliferation im Tierversuch

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

dem

Fachbereich Medizin

der

Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

KARL FRIEDRICH ITTNER

aus Neuhof a. d. Zenn

D 29

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Professor Dr. E. Rügheimer
Referent: Professor Dr. J. Geldmacher
Korreferent: Professor Dr. G. Hegemann

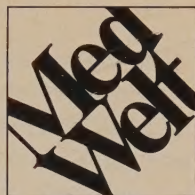
Tag der mündlichen Prüfung: 10. November 1975

Die Medizinische Welt

Begründet von Franz Volhard

Schriftleitung: Prof. Dr. E. Volhard
Prof. Dr. P. Matis · Dr. F. Knüchel

F. K. Schattauer Verlag,
Stuttgart/New York



Stuttgart, 25. Oktober 1974 Nr. 43

Sonderdruck

Einfluß von Kallikrein auf die Bindegewebs- proliferation im Tierversuch

B. Landsleitner, J. Geldmacher, H. Feustel, F. Ittner*

Aus der Abteilung für Handchirurgie und Plastische Chirurgie (Leiter: Prof. Dr. J. Geldmacher) der Chirurgischen Klinik mit Poliklinik der Univ. Erlangen-Nürnberg (Direktor: Prof. Dr. G. Hegemann)

* D 29.



Ein altes Ziel der Medizin überhaupt und der Chirurgie im besonderen ist es, die Bindegewebsneubildung, wie sie z. B. zur Wundheilung notwendig ist, in geordnete Bahnen zu lenken. Die Neubildung von Bindegewebe ist ein sehr komplexer Vorgang, bei dem viele Faktoren mitspielen. Nachdem in letzter Zeit in der Literatur Berichte über einen möglichen Einfluß des als Kininogenase längst bekannten Enzyms Kallikrein auf die Zellteilung verschiedener Zellsysteme auftauchten, untersuchten wir mittels einer speziellen Versuchsanordnung, ob dies auch beim Bindegewebe der Fall ist.

Bereits vor drei Jahren wurde von Geldmacher und König mit Hilfe der gleichen Versuchsanordnung ein hemmender Einfluß des Kallikrein-Inhibitors Trasylol®* auf die Bindegewebsneubildung nachgewiesen. Es liegt also die Frage nahe, ob Kallikrein die Bindegewebsneubildung etwa fördere.

Methodik

Zur Bestimmung der proliferativen Wirkung von Kallikrein auf Bindegewebsstrukturen in quantitativer und qualitativer Hinsicht bedienten wir uns der Methodik nach Selye, der mit Hilfe seiner Gewebsdiaphragmata eine Möglichkeit zur Elementaranalyse der entwicklungsmechanischen Bausteine von Bindegewebsstrukturen eröffnet hat.

Wir wählten die einfachste Form solcher Diaphragmata, nämlich offene Glasröhrchen von 10 mm Länge und 10 mm lichter Weite.

Wird ein derartiges Röhrchen zwischen Haut und Muskelfascie eines Kaninchens eingeführt, so bilden sich an beiden Öffnungen diskoidale bindegewebige Platten aus, auf deren Zentrum das Röhrchen die Proliferationstendenz geradezu brennpunktartig konzentriert. Hierdurch wird an den Zentren der

* Eingetragenes WZ, Bayer AG, Leverkusen.

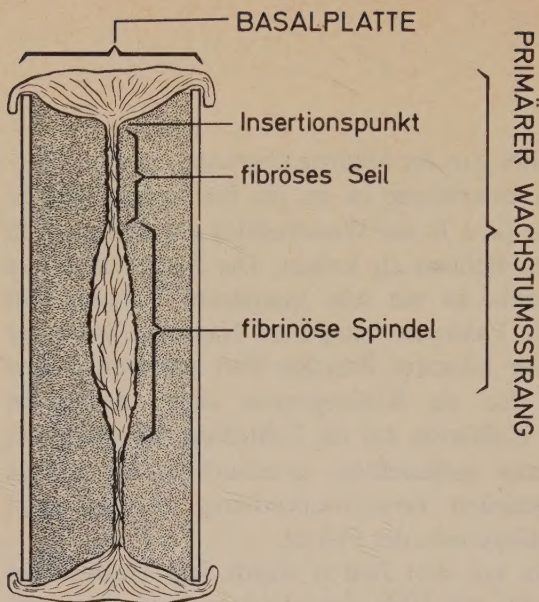


Abb. 1: Schematische Darstellung eines einfachen Desmons nach Selye.

zwei gegenüberstehenden Bindegewebsplatten eine außerordentlich aktive mitotische Fibrozytenproliferation eingeleitet. Die Blutgefäße füllen sich strotzend mit Blut, bersten und senden einander schließlich entlang der Achse des Röhrchens einen Fibrinstrang entgegen, der schon nach etlichen Wochen die einander gegenüberliegenden Basalplatten miteinander verbindet. Gleichzeitig wird der Hohlraum durch eine besondere Flüssigkeit, das „Wachstumsexsudat“, ausgefüllt. Im Laufe der Zeit wandelt sich der fibrinöse Strang in ein vaskularisiertes sehnartiges Seil um. In der Abbildung sehen wir ein derartiges Gebilde, das vergleichbar mit dem Osteon des Knochens, dem Nephron der Niere oder dem Hepaton der Leber von Selye als Desmon, als der entwicklungsmechanische Baustein von Bindegewebsstrukturen bezeichnet wird. Anhand der Ausbildung dieses Desmons läßt sich der Einfluß von verschiedenen Substanzen auf Bindegewebe prüfen.

Material

Hochgereinigte Kallikrein-Substanz erhielten wir von der Firma Bayer, Leverkusen.

Die Aktivität von Kallikrein wird titrimetrisch durch die Abspaltung von Benzoyl-Arginin-Äthyl-Ester bestimmt.

Man gewinnt Produkte von 1050–1150 KE/mg. Die Reinheit beträgt mindestens 80%. Die Verunreinigung durch andere Pankreasproteasen liegt unter 1%.

Wir bekamen Kallikrein in Ampullen mit je 1000 KE (spezifische Aktivität: 1050 KE/mg) in lyophilisierter Form geliefert, die wir kühl aufbewahrten und unmittelbar vor den Versuchen in 10 ml 0,9%iger Kochsalzlösung lösten. 1 ml Flüssigkeit enthielt somit 100 KE.

Als *Versuchstiere* wählten wir 60 reinrassige weibliche speziell pathogenfreie (SPF) Kaninchen der Rasse „Chin“ mit einem mittleren Gewicht von 3000 g.

Wir teilten unsere 60 Versuchstiere in 4 Gruppen (A–D) zu je 15 Tieren ein.

Gruppe A erhielt unmittelbar nach der Operation 200 KE/kg KG transcutan lokal ins Glasröhrchen.

Die Kontrollgruppe B hierzu erhielt lediglich eine entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung ebenfalls nach der Operation.

Gruppe C bekam 14 Tage lang 200 KE/kg KG täglich intravenös über die Ohrvene zugeführt.

Kontrollgruppe D bekam analog dazu physiologische Kochsalzlösung.

Von jeder Gruppe wurden 5 Tiere nach 1, 3 und 6 Wochen getötet.

Durchführung

Die Operationen wurden bei sämtlichen Tieren in Nembutal-Narkose durchgeführt, dabei wurde Nembutal® in die Ohrvene gespritzt. Die Kaninchen vertrugen die Narkose ausgezeichnet. Während der gesamten Versuche ging uns kein Tier ein.

Was die Größe der Glasröhrchen anbetrifft, machten wir uns die Erfahrungen von Geldmacher und König zu eigen und verwendeten beiderseits offene Glasröhrchen mit einer Länge von 10 mm und 10 mm lichter Weite.

Um das Gewebewachstum durch die Bewegungen der Tiere in ihren Käfigen nicht über die Maßen zu beeinflussen, wählten wir als Lokalisation der Glasröhrchen eine „windstille“ Ecke, und zwar die Gegend zwischen den beiden Schulterblättern. Damit war auch die Gewähr gegeben, daß die Röhrchen nicht wanderten und das spätere Auffinden erleichtert wurde.

Nach Enthaarung und Desinfektion des Operationsfeldes wurde in Nembutal-Narkose bei jedem Tier über dem Kreuzbein ein 3 cm langer Hautschnitt quer zur Wirbelsäule bis zur Muskelfascie angelegt. Von hier aus wurde mit Hilfe einer Kornzange zwischen Haut und Muskelfascie ein Kanal bis zur Schultergegend gebildet und darin besagtes Röhrchen bis zwischen die Schulterblätter vorgeschoben und dort deponiert. Anschließend wurde die Operationswunde mit atraumatischen Nähten vernäht.

Sämtliche Tiere wurden unter gleichen streng aseptischen Bedingungen operiert, um Infektionen und Störungen in der Wundheilung auszuschließen.

Im Anschluß an die Operation wurde den Tieren Kallikrein bzw. physiologische Kochsalzlösung in oben beschriebener Weise zugeführt.

Nach der vorgeschriebenen Zeit wurden die Tiere getötet und die Röhrchen samt Inhalt sauber herauspräpariert. Die mikroskopische Beurteilung des Gewebeinhalts erfolgte in der Abteilung für klinische Pathologie unserer Klinik (Leiter: Prof. Hermanek).

Ergebnisse

A) makroskopisch: Die von Selye beschriebenen Desmone wurden erst bei der 6-Wochen-Serie festgestellt. Bei den lokal mit Kallikrein behandelten Tieren (Gruppe A) waren die Desmone in jedem Fall vorhanden und in Größe und Aussehen einander sehr ähnlich, während sie bei den anderen Tiergruppen untereinander recht unterschiedlich, zum Teil gar nicht vorhanden waren.

Röhrcheninhalt von 2 Tieren der 6-Wochen-Serie:
links: Beispiel der Gruppe A (Kallikrein lokal)
rechts: Beispiel der Gruppe B (physiologische NaCl-Lösung lokal)

B) mikroskopisch: Der Röhrcheninhalt wurde in 2 Obergruppen eingeteilt, nämlich in solche

- I) mit Fibrinexsudat
- II) ohne Fibrinexsudat

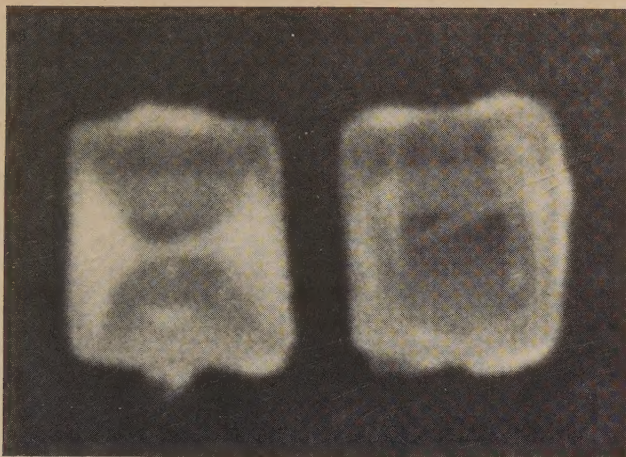


Abb. 2

Obergruppe I wurde weiter danach unterteilt, ob die Röhren zusätzlich

- a) junges Bindegewebe enthielten
- und ob dieses
- b) kapillarreich
- oder c) kapillararm war.

Bei der Obergruppe II wurde qualitativ unterschieden

- a) Fettgewebe
- b) reifes Bindegewebe
- c) Kapillarreichtum
- d) Bildung kollagener Fasern

Ferner wurde eine grobe quantitative Einteilung getroffen. Um diese in einer graphischen Darstellung verdeutlichen zu können, übersetzten wir diese groben Angaben zeichnerisch folgendermaßen:

1. *Fibrinexsudat*

überwiegend Exsudat

Exsudat et al. zu gleichen Teilen

wenig Exsudat

kein Exsudat

2. *junges Bindegewebe*

reichlich junges Bindegewebe

junges Bindegewebe et al. zu gleichen Teilen

am Rand nur spärlich junges Bindegewebe

kein junges Bindegewebe

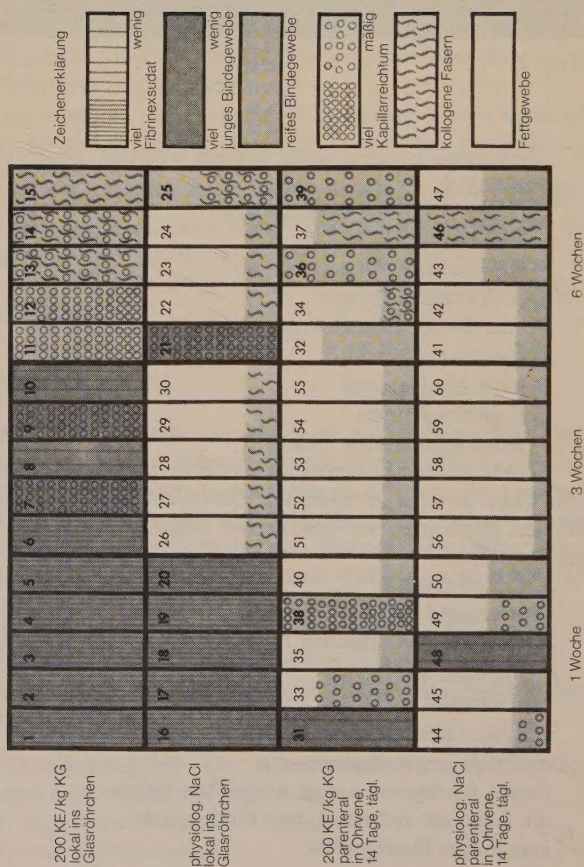


Abb. 3

3. *reifes Bindegewebe*
nur reifes Bindegewebe
mehr als $\frac{2}{3}$ Bindegewebe
 $\frac{1}{3}$ bis $\frac{2}{3}$ Bindegewebe
bis $\frac{1}{3}$ Bindegewebe
kein reifes Bindegewebe

4. *Bildung kollagener Fasern*
ausgeprägt kollagene Fasern
keine oder minimal kollagene Fasern

5. *Kapillarreichtum*
reichlich Kapillaren
mäßig Kapillaren
kapillarm

6. *Fettgewebe*
nur Fettgewebe
mehr als $\frac{2}{3}$ Fettgewebe
 $\frac{1}{3}$ bis $\frac{2}{3}$ Fettgewebe
bis $\frac{1}{3}$ Fettgewebe
kein Fettgewebe

In der *graphischen Darstellung* sind sämtliche Ergebnisse zusammengefaßt. Ein Rechteck entspricht einem Glasröhrchen.

Auswertung

Auffällig ist:

1. die starke Fibrinbildung sowie die Bildung jungen Bindegewebes nach 1 Woche bei den lokal behandelten Tieren,
2. die Bildung von kollagenen Fasern nach 3 Wochen bei Gruppe B,
3. der Fibrinnachweis noch nach 3 Wochen bei Gruppe A,
4. das Vorhandensein von ausschließlich jungem Bindegewebe nach 3 Wochen bei Gruppe A,
5. der Kapillarreichtum bei Gruppe A,
6. das Vorhandensein von ausschließlich reifem Bindegewebe nach 6 Wochen bei Gruppe A,
7. das völlige Fehlen von Fettgewebe bei Gruppe A.

Die lokal mit Kallikrein behandelten Tiere (Gruppe A) heben sich also auch im mikroskopischen Befund von allen anderen ab.

Die Tatsache, daß nur bei Gruppe A, bei den lokal mit Kallikrein behandelten Tieren also, nach 3 Wochen ausschließlich junges Bindegewebe vorhanden ist, spricht dafür, daß das lokal ins Glasröhrchen gesetzte Kallikrein-Depot einen proliferationsfördernden Reiz zur Bildung jungen Bindegewebes wie auch zu anhaltender Fibrinausschüttung darstellt.

Dafür, daß Kallikrein die Bindegewebsneubildung in geordnete Bahnen lenkt, spricht weiterhin die gleichartige Beschaffenheit der Desmone sowie die ausschließliche Bildung von reifem Bindegewebe nach 6 Wochen wie auch das Fehlen von störendem Fettgewebe.

Die intravenöse Applikation von Kallikrein (Gruppe C) brachte nicht den gewünschten Erfolg, obwohl wir mehr reifes Bindegewebe als bei den nicht mit Kallikrein behandelten Tieren fanden. Eine einmalige lokale Gabe hoher Dosen Kallikrein ist also wesentlich wirksamer als eine langdauernde intravenöse Gabe gleich hoher Dosen.

Zusammenfassung

Es wurde an Kaninchen ein möglicher Einfluß von Kallikrein auf die Bindegewebsneubildung geprüft. Wir bedienten uns zweier Applikationsformen von Kallikrein:

1. die einmalige lokale Applikation von 200 KE/kg KG transcutan in ein zwischen Haut und Muskelfascie liegendes Glasröhrchen,
2. die intravenöse Gabe von 200 KE/kg KG über 14 Tage täglich.

Die Menge sowie die Art des neugebildeten Gewebes wurde unter Zuhilfenahme der Selyeschen Versuchsanordnung bestimmt.

Insgesamt wurden 60 Tiere operiert. 15 davon wurden lokal, 15 weitere intravenös mit Kallikrein behandelt. Die restlichen Tiere erhielten als Kontrollgruppen in genau entsprechender Weise physiologische Kochsalzlösung. Jeweils 5 Tiere wurden nach 1, 3 und 6 Wochen getötet. Nach 1 Woche wurde bei den lokal mit Kallikrein wie auch bei den lokal mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tieren noch reichlich Fibrinxsudat nachgewiesen. Ab der 3. Woche unterscheidet sich die Gruppe der lokal mit Kallikrein behandelten Tiere wesentlich von allen anderen. Es wurde bei dieser noch nach 3 Wochen Fibrinxsudat nachgewiesen, weiterhin fand man reichlich junges Bindegewebe, das in dieser Zeit bei keiner anderen Gruppe gefunden wurde. Nach 6 Wochen hat sich auch wesentlich mehr und gefäßreicheres Bindegewebe als bei den anderen Gruppen ausgebildet.

Literatur

- (1) Geldmacher, J., D. U. König: Handchirurgie **4**: (1971). — (2) Haberland, G. L., J. W. Rohen: Kininogenase — Kallikrein. Schattauer, Stuttgart 1973. — (3) Kern, E., C. Kuhbier: *Ergebn. Chir.* **46**: 48 (1964). — (4) Selye, H.: *Med. Welt* **1959**: 617–622. — (5) Vorster, C.: *Helv. Chir. Acta* **33**: 308 (1966).

(Anschrift f. d. Verff.: Dr. B. Landsleitner, Chir. Univ.-Klinik, 852 Erlangen, Krankenhausstr. 12.)

L e b e n s l a u f

Am 25. Januar 1949 wurde ich, Karl Friedrich Ittner, als erstes von drei Kindern des Landwirtschaftsehepaares Leonhard und Babette Ittner geb. Enzner in Adelsdorf/Mfr. geboren. Meine Eltern bewirtschaften dort einen landwirtschaftlichen Klein- bis Mittelbetrieb.

Von 1955 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in Markt Erlbach, dann wechselte ich auf das Hardenberg-Gymnasium (früher Oberrealschule) Fürth/Bay. über, wo ich 1969 mein Abitur ablegte. Seit dem Wintersemester 1969/70 studiere ich Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen, an der ich am 31. Juli 1970 mein Vorphysikum, am 17. März 1972 mein Physikum bestand.

Am 13. August 1975 legte ich hier auch das Staatsexamen in Medizin mit der Note "sehr gut" ab.

